

PUB-NO: EP001468968A1  
DOCUMENT-IDENTIFIER: EP 1468968 A1  
TITLE: Biocatalyst containing a laccase  
PUBN-DATE: October 20, 2004

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
GUEBITZ, GEORG PROF DR	AT
CAVACO-PAULO, ARTUR PROF DR	PT
KANDELBAUER, ANDREAS DR	AT
SCHROEDER, MARC DIPL-ING	LU
HELD, CHRISTOF INGO DIPL-ING	AT

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TECH UNI	AT

APPL-NO: EP03450096

APPL-DATE: April 18, 2003

PRIORITY-DATA: EP03450096A ( April 18, 2003)

INT-CL (IPC): C02F003/00, C12N009/02 , C12N011/00

EUR-CL (EPC): C12N009/02 ; C12N011/00, C12P001/00

## ABSTRACT:

CHG DATE=20050122 STATUS=O>Use of bacterial laccase for chemical treatment of phenolic compounds and/or aromatic amines, especially dyes, is claimed. An Independent claim is also included for biocatalyst for chemical treatment of phenolic compounds and/or aromatic amines, especially dyes, comprising bacterial spores containing laccase, immobilized in and/or on a support.

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
20.10.2004 Patentblatt 2004/43

(51) Int Cl.7: **C02F 3/00**, C12N 9/02,  
C12N 11/00

(21) Anmeldenummer: 03450096.7

(22) Anmeldetag: 18.04.2003

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HU IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI SK TR  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK

(71) Anmelder: Technische Universität,  
Institut für Mikrobiologie und Abfalltechnologie  
8010 Graz (AT)

(72) Erfinder:  
• Güblitz, Georg, Prof. Dr.  
8047 Graz (AT)

• Cavaco-Paulo, Artur, Prof. Dr.  
4715 1919 Braga (PT)  
• Kandelbauer, Andreas, Dr.  
8680 Mürzzuschlag (AT)  
• Schroeder, Marc, Dipl.-Ing.  
9753 Helnerscheld (LU)  
• Held, Christof, Ingo, Dipl.-Ing.  
8020 Graz (AT)

(74) Vertreter: Schwarz, Albin, Dr. et al  
Wipplingerstrasse 32  
1010 Wien (AT)

(54) **Eine Laccase enthaltender Biokatalysator**

(57) Zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, insbesondere Farbstoffe, wird ein Biokatalysator bereitgestellt, der dadurch gekennzeichnet ist, dass laccasehaltige bakterielle Sporen in und/oder auf einem Träger immobilisiert

sind. Die bakteriellen Laccasen können im Gegensatz zu Pilzlaccasen auch bei höheren Temperaturen und pH-Werten eingesetzt werden.

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung bakterieller Enzyme. Ferner betrifft die Erfindung einen Biokatalysator zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, insbesondere Farbstoffe, sowie ein Verfahren zum Entfärben von Textilprozesswässern und/oder -abwässern.

[0002] Unter chemischer Behandlung im Sinne der vorliegenden Erfindung werden zum Beispiel oxidative Abbaureaktionen und oxidative Kupplungen verstanden.

[0003] Phenolische Verbindungen und Aniline können unter dem Einfluss von Enzymen modifiziert und vollständig mineralisiert werden. Diese Klasse von Prozessen wird in diversen industriellen Anwendungen genutzt, z. B. zur Entfärbung von Farbstoffen und Pigmenten, in der Reinigung von Abwässern von Textilfabriken und Olivenverpressungsanlagen, bei der Behandlung von Wein oder der Biotransformation organischer Chemikalien.

[0004] Laccasen, oxidative Enzyme, die insbesondere von Weißfäulepilzen gebildet werden, sind besonders geeignet für großtechnische Anwendungen, da sie abgesehen von molekularem Sauerstoff als Cosubstrat keinerlei teure Cofaktoren wie NAD(P)H oder FADH benötigen und aufgrund ihrer breiten Substratspezifität vielfältig einsetzbar sind.

[0005] Es ist bereits seit einigen Jahren bekannt, dass Laccasen aus Pilzen zur Entfärbung von Prozesswässern eingesetzt werden können. In der US 5,795,855 A und von Call et al. (J. Biotechnol. 53 (1997), 163-202) wird der Einsatz von Laccasen, besonders unter Zusatz von niedermolekularen Mediatoren (GB 2 304 107 A), zur Entfärbung von ligninhaltigen Wässern, die in der Zellstoffindustrie oder bei der Papiererzeugung anfallen, beschrieben. Reaktoren zur Entfärbung von farbstoffhaltigen Abwässern aus der Textilindustrie wurden in der US 6,399,561 B beschrieben.

[0006] Die Fleckentfärbung von Textilien im Zuge der Reinigung von Kleidung kann ebenfalls durch den Zusatz von Laccasen erfolgen (GB 2 304 107 A). In ähnlicher Weise kann überschüssiger Farbstoff von nach verschiedenen Färbverfahren gefärbten Textilien Laccase-katalysiert entfernt werden, wie in der WO 01/48304 A beschrieben. Die US 6,322,596 B beschreibt ein Verfahren, bei dem die Laccase-katalysierte Farbstoffentfärbung dazu ausgenutzt wird, gezielte Entfärbungsmuster auf vorgefärbten Stoffen zu erzeugen. Dabei wird über ein Inkjet-Printing-Verfahren eine Lösung mit einem Laccasepräparat auf das gefärbte Material an definierten Stellen aufgebracht, die sich entfärben und ein Muster auf dem gefärbten Untergrund hinterlassen.

[0007] Unter bestimmten Reaktionsbedingungen können Laccasen auch als Polymerisationskatalysatoren fungieren (Aktas et al., Bioresource Technology 80 (2001), 29-36; Ikeda et al., Macromolecules 29 (1996),

3053-3054) bzw. oxidative Kupplungsreaktionen herbeiführen (US 6,471,730 B). Laccasen können auch eingesetzt werden, um gefärbte Substanzen zu erzeugen. So ist etwa durch die oxidative Kupplung eines methylierten Hydroxyanthranilsäure-Derivats von Osladacz et al. (J. Biotechnol. 72 (1999), 141-149) ein heterocyclischer Actinocinfarbstoff erzeugt worden.

[0008] Erst kürzlich wurde über die Verwendung von Laccasen zur Synthese einer Reihe von teilweise neuen Farbstoffen berichtet. Besonderes Interesse hat dabei die z.B. in der US 6,471,730 B, der EP 1 240 890 A, der WO 00/57848 A und der US 5,948,121 A beschriebene simultane in-situ Färbung von Keratinfasern durch ein Laccasepräparat auf sich gezogen. Eine analoge in-situ Färbeprozedur für Textilien wurde vor kurzem in der US 6,296,672 B vorgeschlagen.

[0009] Alle oben genannten Verfahren basieren auf der Verwendung von Laccasen aus Pilzen, die entweder mit Pilzen oder cloniert in Bakterien und Hefen (Jonsson et al., Curr. Genet. 32.6 (1997), 425-430; WO 01/92498 A) produziert werden.

[0010] Laccasen können als freie Enzyme eingesetzt werden, was allerdings den Nachteil hat, dass sie in Prozessen nicht im Kreislauf geführt und damit nicht mehrfach verwendet werden können. Deshalb basieren industrielle Prozesse auf der Verwendung von immobilisierten Laccasen.

[0011] Laccasen, die aus unterschiedlichen Weißfäulepilzen gewonnen werden können, sind in Umgebungen von saurem bis neutralem pH bei moderaten Temperaturen, d.h. unterhalb von 50°C, einsetzbar. Für eine Vielzahl von Anwendungen wäre es jedoch von Vorteil, auch über Laccasesysteme zu verfügen, die im Alkalischen und bei erhöhter Temperatur noch hohe Aktivitäten zeigen. Pilzlaccasen werden unter solchen Bedingungen in der Regel inaktiviert und zerstört.

[0012] Gewöhnlich kommen für die Biotransformationen und enzymatischen Abbaureaktionen lebende Pilze zum Einsatz. Größter Nachteil dieser Methode ist neben der Beschränkung auf physiologische Umgebungstemperaturen und pH-Werte beispielsweise des Abwassers die zum Zellwachstum benötigte kontinuierliche Zuführung von Nährstoffen und Mineralien. Zudem werden neben der gewünschten Laccase immer auch andere, in der Regel unerwünschte Stoffwechselprodukte in das umgebende Medium ausgeschieden.

[0013] Die Erfindung bezweckt die Überwindung der oben genannten Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, Laccasen zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine bereitzustellen sowie einen Biokatalysator, der bei höheren Temperaturen und pH-Werten eingesetzt werden kann und weder Nährstoffe benötigt, noch unerwünschte Nebenprodukte erzeugt. Ferner soll ein Verfahren zum Entfärben von Textilprozesswässern und/oder -abwässern vorgesehen werden.

[0014] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung bakterieller Laccasen, insbesondere in

Form laccasehaltiger bakterieller Sporen gelöst.

[0015] Vorzugsweise werden die bakteriellen Laccasen zum Entfärben eingesetzt, wobei die Farbstoffe oxidativ abgebaut werden.

[0016] In bevorzugter Weise werden die bakteriellen Laccasen zur Synthese von Farbstoffen verwendet, wobei die Synthese über eine oxidative Kupplungsreaktion erfolgt.

[0017] Von Diamantidis et al. (Soll Biology and Biochemistry 32.7 (2000), 919-927) sowie Martins et al. (J. Biol. Chem. 277.21 (2002), 18849-18859) wurden Laccasen auch schon als originär in Bakterien nachgewiesen und sowohl hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften als auch ihrer genetischen Provenienz charakterisiert. Die Anwendung bakterieller Laccasen oder laccasehaltiger bakterieller Sporen zur chemischen Behandlung, insbesondere zum oxidativen Abbau oder zur oxidativen Kupplung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, besonders von Farbstoffen, wurde jedoch nicht beschrieben.

[0018] Im Gegensatz zu Laccasen von Weißfäulepilzen weisen bakterielle Laccasen zumeist pH-Optima im alkalischen Bereich auf und sind auch unempfindlicher gegenüber extremeren Temperaturen.

[0019] Der erfindungsgemäße enzymatische Biokatalysator ist dadurch gekennzeichnet, dass laccasehaltige bakterielle Sporen in und/oder auf einem Träger immobilisiert sind.

[0020] Der erfindungsgemäße Biokatalysator macht sich originär von Bakterien gebildete und an der Sporenoberfläche immobilisierte Phenoloxidasen zunutze und ermöglicht damit die Anwendung einer einfach handhabbaren Biokatalysatorform mit neuem Eigenschaftsprofil hinsichtlich der Stabilität und der anwendbaren Reaktionsbedingungen im industriellen Umfeld von Textilindustrie, Papier- und Zellstoffindustrie sowie ähnlichen Industrien, bei deren Tätigkeiten Verbindungen entstehen, die potentiell durch Einwirkung von Laccasen oxidierbar sind.

[0021] Vorzugsweise ist der Träger für die laccasehaltigen Sporen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus natürlichen und synthetischen Schwämmen, pulverisierten Cellulosematerialien, Holzzrinde, Calciumalginat-Gelen, Aluminiumoxid, Glas, natürlichen und synthetischen Polymeren und Copolymeren.

[0022] Die Immobilisierung ist bevorzugt durch mindestens eines, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Absorption, Einschluss und kovalente Bindung erfolgt, wobei die kovalente Bindung vorzugsweise über funktionelle Gruppen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminen, Alkoholen, Hydroxiden, Thiolen, Carbonylen und Epoxiden, erfolgt ist.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Sporen mittels eines Polymerspacers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyethylen glykol, Polyethoxyethylen, BSA, Cellulose, Dextran und Xylan, kovalent an den Träger gebunden.

[0024] Vorzugsweise stammen die Sporen von laccase-

setragenden *Bacillus sp.* oder *Clostridien sp.*, insbesondere *Bacillus subtilis*.

[0025] Das erfindungsgemäße Verfahren zum Entfärben von Textilprozesswässern und/oder abwässern ist dadurch gekennzeichnet, dass die Prozess- und/oder Abwässer mit einem erfindungsgemäßen Biokatalysator in Kontakt gebracht werden.

[0026] Die harten Bedingungen, die üblicherweise in Textilprozesswässern vorherrschen, wirken sich aufgrund der Eigenschaften der bakteriellen Laccasen weitaus weniger drastisch aus, wohingegen Pilzsysteme für solche Anwendungen nahezu gänzlich ungeeignet sind. Im Zusammenhang mit der Anwendung von Sporen wirken sich die äußerst lebensfeindlichen Bedingungen sogar positiv aus, da sie das Auskeimen der Sporen verhindern. Die Immobilisierung der Sporen auf geeigneten Trägermaterialien liefert folglich eine einfache und praktikable Lösung für das Problem kontinuierlicher Biotransformationen, insbesondere in der Aromatenmodifikation.

[0027] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die Prozess- und/oder Abwässer in einem Rohrreaktor mit dem Biokatalysator in Kontakt gebracht und kontinuierlich entfärbt.

[0028] Besonders vorteilhaft ist das Verfahren, wenn das entfärbte Abwasser im Färbeprozess wiederverwendet wird.

[0029] Eine Kombination des erfindungsgemäßen Biokatalysators mit Mediatoren (redoxaktiven Substanzen) ist ebenfalls ögklich. Der Anwendungsbereich der laccasehaltigen bakteriellen Sporen kann dadurch noch erweitert werden.

[0030] Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiele:

#### Gewinnung der laccasehaltigen Sporen

[0031] Im Zuge eines groß angelegten Screeningverfahrens nach Laccase produzierenden Bakterien wurde eine Reihe von Stämmen identifiziert, in deren Sporen Laccasen nachweisbar waren. Die Bakterien wurden demgemäss bevorzugt auf einem Sporulationsmedium gezüchtet. Für die Anwendung bei hohen pH-Werten und Temperaturen erwiesen sich insbesondere *Bacillus sp.* mit einem pH-Optimum von 10 und einem Temperaturoptimum von 65°C als geeignet für die Produktion laccasehaltiger Sporen.

[0032] Nach Inkubationszeiten zwischen 24 und 36 Stunden wurden nur Sporen im Fermentationsmedium nachgewiesen. Die bakteriellen Sporen wurden geerntet und vom Kultivationsmedium durch Zentrifugation bei 11.000 g bzw. über Filtration mit 0,45 µm - Filtern abgetrennt. Die Laccaseaktivität der Sporen erwies sich sowohl gegenüber alkalischen pH-Werten als auch gegenüber erhöhter Temperatur als stabil. Die Halbwertszeit der Laccaseaktivität der *Bacillus subtilis* - Sporen

betrug so beispielsweise bei pH 9,3 und 80°C 25 Minuten. Die Laccaseaktivität erscheint gegenüber hohen pH-Werten weitgehend unempfindlich. Anschließend wurden die Sporen gewaschen und wie nachfolgend beschrieben immobilisiert. Der angeführte Immobilisierungsprozess verhindert die Keimung der Sporen unter den Bedingungen des oxidativen Abbaus bzw. der Biotransformation.

#### Immobilisierung der Sporen

**[0033]** Im Fall des vorzugsweise eingesetzten  $\gamma$ -Aluminiumoxids wurden Aminogruppen mit Hilfe von Triethoxysilanpropylamin in Aceton auf der Oberfläche des Trägers verankert. Als Vernetzungsreagens diente ein bifunktionales Aldehyd, wie etwa Glutaraldehyd oder höhere Homologe. Auch andere bifunktionelle reaktive Reagenzien können verwendet werden, wie zum Beispiel Aldehyddextran, Aminodextran, Polyethylenglykoldiamin, etc.

**[0034]** Die Sporen wurden gereinigt und in den folgenden Verfahrensschritten als Pulver eingesetzt. Die Sporen wurden mittels Glutaraldehyd oder höheren Homologen, vorzugsweise bei einem pH zwischen 7 und 9, kovalent an den Träger gebunden.

#### Beispiel 1

**[0035]** Aluminiumoxid-Kugeln wurden zweimal in einer 6% (v/v) Aminopropyltriethoxysilan-Aceton-Lösung für 18 Stunden auf 60°C erhitzt. Die silanisierten Kugeln wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für zwei Stunden bei 20°C in eine 10% (v/v) wässrige Glutaraldehydlösung gegeben.

**[0036]** Ferner können Sporen mittels eines Polymer-spacer kovalent an einen Träger gebunden werden. Als Spacer können synthetische Polymere, wie Polyethylenglykol, Polyethoxyethylen, etc., und natürliche Materialien, wie BSA, und diverse Polysaccharide (Cellulose, Dextran, Xylan, etc.) genutzt werden.

**[0037]** Die funktionellen Endgruppen des Polymers müssen aktiviert werden. Hierzu können unterschiedliche Reagenzien, wie z.B. Epichlorhydrin, Carbonyldiimidazol oder Cyanurchlorid, verwendet werden. Vorteilhaft dabei sind Hydroxygruppen, es können aber auch freie Amingruppen genutzt werden.

#### Beispiel 2

**[0038]** 4 g PEG (Polyethylenglykol) und 2 g 1,1'-Carbonyldiimidazol wurden in 100 ml trockenem Dimethylsulfoxid suspendiert und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das aktivierte Polymer filtriert, gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

**[0039]** Die Länge des Spacers kann mittels des Molekulargewichts des Polymers definiert werden und ist abhängig von der Art der zu immobilisierenden Sporen.

**[0040]** Das aktivierte Polymer wurde in schwach ba-

sischem Medium an den Träger angehängt.

#### Beispiel 3

**[0041]** Unterschiedliche Konzentrationen (zwischen 0,01 und 0,1 g/ml) des aktivierten Polymers wurden eingesetzt, um eine homogene und optimale Beladung der Trägeroberfläche zu erzielen. Die Sporen wurden mit vorgelegtem modifiziertem Träger in einem entsprechenden Puffer suspendiert. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt, anschließend filtriert und mit Kaliumphosphat-Puffer gewaschen. Die immobilisierten Sporen wurden unter Kühlung aufbewahrt.

#### Entfärbung von Prozesswasser

#### Beispiel 4

**[0042]** Textil-Färbeabwässer, welche 50 mg/l Diamond-Black als Hauptfarbstoff enthielten, wurden in einem Rohrreaktor mit immobilisierten Sporen behandelt. Ein Liter dieses Abwassers wurde bei pH 9 und einer Temperatur von 60°C innerhalb von 35 Minuten entfärbt. Dieses entfärbte Abwasser wurde zum Färben mit Reaktivfarbstoffen - CI Reactive Orange 70 und CI Reactive Blue 214 - anstelle von Frischwasser eingesetzt. Die Farbstoffe wurden auf gebleichten Baumwollstoffen in zwei Abstufungen eingesetzt: schwach - 0,5%, bezogen auf das Stoffgewicht und stark - 3%, bezogen auf das Stoffgewicht, mit 20 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 60 g/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Flüssigkeitsverhältnis 1:20.

**[0043]** Der Farbunterschied, bezogen auf Stoffe, die mit Frischwasser gefärbt wurden, ergab bei 0,5% ein  $\Delta E^*$  von 0,912 für Reactive Orange 70 und ein  $\Delta E^*$  von 0,174 für Reactive Blue 214. Für eine Farbabstufung von 3% war  $\Delta E^*$  0,342 für Reactive Orange 70 und 0,129 für Reactive Blue 214.

#### Beispiel 5

**[0044]** Textil-Färbeabwässer, welche 50 mg/l Diamond Fast Brown als Hauptfarbstoff enthielten, wurden in einem Rohrreaktor mit immobilisierten Sporen behandelt. Ein Liter dieses Abwassers wurde bei pH 9 und einer Temperatur von 60°C innerhalb von 50 Minuten entfärbt. Dieses entfärbte Abwasser wurde zum Färben mit Reaktivfarbstoffen - CI Reactive Orange 70 und CI Reactive Blue 214 - anstelle von Frischwasser eingesetzt. Die Farbstoffe wurden auf gebleichten Baumwollstoffen in zwei Abstufungen eingesetzt: schwach - 0,5%, bezogen auf das Stoffgewicht und stark - 3%, bezogen auf das Stoffgewicht, mit 20 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 60 g/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Flüssigkeitsverhältnis 1:20.

**[0045]** Der Farbunterschied, bezogen auf Stoffe, die mit Frischwasser gefärbt wurden, ergab bei 0,5% ein  $\Delta E^*$  von 1,105 für Reactive Orange 70 und ein  $\Delta E^*$  von 0,640 für Reactive Blue 214. Für eine Farbabstufung

von 3% war  $\Delta E^*$  0,731 für Reactive Orange 70 und 0,319 für Reactive Blue 214.

#### Beispiel 6

[0046] Textil-Färbeabwässer, welche 50 mg/l Indigo als Hauptfarbstoff enthielten, wurden mit immobilisierten Sporen behandelt. Ein Liter dieses Abwassers wurde bei pH 9 und einer Temperatur von 60°C innerhalb von 65 Minuten entfärbt. Dieses entfärbte Abwasser wurde zum Färben mit Reaktivfarbstoffen - CI Reactive Orange 70 und CI Reactive Blue 214 - anstelle von Frischwasser eingesetzt. Die Farbstoffe wurden auf gebleichten Baumwollstoffen in zwei Abstufungen eingesetzt: schwach - 0,5%, bezogen auf das Stoffgewicht und stark - 3%, bezogen auf das Stoffgewicht, mit 20 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 60 g/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Flüssigkeitsverhältnis 1:20.

[0047] Der Farbunterschied, bezogen auf Stoffe, die mit Frischwasser gefärbt wurden, ergab bei 0,5% ein  $\Delta E^*$  von 2,726 für Reactive Orange 70 und ein  $\Delta E^*$  von 1,465 für Reactive Blue 214. Für eine Farbabstufung von 3% war  $\Delta E^*$  0,853 für Reactive Orange 70 und 0,699 für Reactive Blue 214.

[0048] Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens entfärbte Textilprozesswässer und/oder -abwässer vorteilhaft rückgeführt und erneut im Färbeprozess eingesetzt werden können.

#### Synthese von Farbstoffen unter oxidativer Kupplung

#### Beispiel 7

[0049] Lösungen mit 1 g/l Indigo Carmine wurden in Gegenwart von 100 mg/l Isatin-5-sulfonsäure bei 45°C und einem pH-Wert > 5 für drei Stunden mit immobilisierten Sporen behandelt. Dabei wurde aus dem blau-gefärbten Indigo Carmine ein neuer roter Farbstoff erzeugt. Das entsprechende oxidative Kopplungsprodukt mit einem um 249 Einheiten vergrößerten Molekulargewicht wurde mittels einer Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektroskopie nachgewiesen.

#### Beispiel 8

[0050] Die zwei wasserlöslichen Farbstoffzwischenstufen, 4-Aminodiphenylamin-2-sulfonsäure (CAS 91-30-5) und 5-Amino-2-naphthalensulfonsäure (CAS 199-79-9), wurden in einem kontinuierlichen Verfahren mit immobilisierten Sporen bei 80°C, einem pH-Wert > 5 und einer Verweilzeit von 45 Minuten behandelt. Dabei wurden ein brauner und ein blauer zur Färbung von Textilien geeigneter Farbstoff erhalten. Durch oxidative Kupplung der Farbstoffvorstufen wurden auch rote, violette und dunkelblaue Produkte erhalten, welche ebenfalls zur Färbung von Stoffen geeignet sind.

#### Patentansprüche

1. Verwendung bakterieller Laccasen zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, insbesondere Farbstoffe.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Entfärbung, wobei die chemische Behandlung eine oxidative Abbaureaktion ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 zur Synthese von Farbstoffen, wobei die chemische Behandlung eine oxidative Kupplung ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in Form laccasehaltiger bakterieller Sporen.
5. Biokatalysator zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, insbesondere Farbstoffe, **gekennzeichnet** durch in und/oder auf einem Träger immobilisierte laccasehaltige bakterielle Sporen.
6. Biokatalysator nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Träger ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus natürlichen und synthetischen Schwämmen, pulverisierten Cellulosematerialien, Holzzinde, Calciumalginat-Gelen, Aluminiumoxid, Glas, natürlichen und synthetischen Polymeren und Copolymeren.
7. Biokatalysator nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Immobilisierung durch mindestens eines, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Adsorption, Einschluss und kovalente Bindung, erfolgt ist.
8. Biokatalysator nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die kovalente Bindung über funktionelle Gruppen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminen, Alkoholen, Hydroxiden, Thiolen, Carbonylen und Epoxiden, erfolgt ist.
9. Biokatalysator nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sporen mittels eines Polymerspacers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyethylenglykol, Polyethoxyethylen, BSA, Cellulose, Dextran und Xylan, kovalent an den Träger gebunden sind.
10. Biokatalysator nach einem der Ansprüche 5 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sporen von laccasetragenden *Bacillus sp.* oder *Clostridium sp.*, insbesondere *Bacillus subtilis*, stammen.
11. Verfahren zum Entfärben von Textilprozesswässern und/oder -abwässern, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Prozess- und/oder Abwässer mit ei-

nem Biokatalysator gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10 in Kontakt gebracht werden.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Prozess- und/oder Abwässer in einem Rohrreaktor mit dem Biokatalysator in Kontakt gebracht und kontinuierlich entfärbt werden. 5
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** das entfärbte Abwasser im Färbeprozess wiederverwendet wird. 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

6



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 03 45 0096

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	CLAUS H ET AL: "Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 59, Nr. 6, September 2002 (2002-09), Seiten 672-678, XP002255912 September, 2002 ISSN: 0175-7598	1-4	C02F3/00 C12N9/02 C12N11/00
Y	* Seite 672 - Seite 677 *	5-13	
D,Y	MARTINS LIGIA O ET AL: "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 277, Nr. 21, 24. Mai 2002 (2002-05-24), Seiten 18849-18859, XP002255913 May 24, 2002 ISSN: 0021-9258	5-13	
	* Seite 18858, rechte Spalte *		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
X	EP 1 226 882 A (IDEMITSU KOSAN CO) 31. Juli 2002 (2002-07-31)	1-4	C02F C12N
Y	* Ansprüche 1-23 *	5-13	
Y	WO 98 55406 A (BEVIL SPRL ;KNAPEN GUY (BE)) 10. Dezember 1998 (1998-12-10) * Seite 3, Zeile 14 - Zeile 28; Ansprüche 1-19 *	5-13	
-/--			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 29. September 2003	Prüfer Glod, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund C : nichtöffentliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

SPO FORM 1503 (02/03)





Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 03 45 0096

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
D,A	DIAMANTIDIS GRIGORIOS ET AL: "Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipoferum." SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY, Bd. 32, Nr. 7, Juli 2000 (2000-07), Seiten 919-927, XP002255914 ISSN: 0038-0717 * Zusammenfassung *	1-13	
A	CLAUS HARALD: "Laccases and their occurrence in prokaryotes." ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, Bd. 179, Nr. 3, 20. März 2003 (2003-03-20), Seiten 145-150, XP002255915 ISSN: 0302-8933 * Seite 146 - Seite 149 *	1-13	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 29. September 2003	Prüfer Glod, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 03 02 (P04020)



Europäisches  
Patentamt

Nummer der Anmeldung

EP 03 45 0096

#### GEBÜHRENPFlichtIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

#### MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt B

- ☐ Alle weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:



Europäisches  
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT  
DER ERFINDUNG  
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung  
EP 03 45 0096

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

**1. Ansprüche: 1-4**

Verwendung bakterieller Laccasen zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine

**2. Ansprüche: 5-13**

Biokatalysator zur chemischen Behandlung phenolischer Verbindungen und/oder aromatischer Amine, insbesondere Farbstoffe, gekennzeichnet durch in und/oder auf einem Träger immobilisierte laccasehaltige bakterielle Sporen und Verfahren zum Entfärben von Textilprozesswässern mit diesem Biokatalysator

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 03 45 0096

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-09-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1226882 A	31-07-2002	JP 2001157576 A	12-06-2001
		JP 2002027971 A	29-01-2002
		JP 2002028692 A	29-01-2002
		AU 7444200 A	24-04-2001
		CA 2388446 A1	29-03-2001
		EP 1226882 A1	31-07-2002
		WO 0121332 A1	29-03-2001
WO 9855406 A	10-12-1998	AU 7632498 A	21-12-1998
		WO 9855406 A1	10-12-1998
		BE 1011797 A6	11-01-2000
		EP 0986519 A1	22-03-2000
		ES 2168758 T3	16-06-2002
		JP 2002503142 T	29-01-2002

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82